

## 胆甾醇疏水改性的羧乙基普鲁兰多糖合成及自组装性质\*\*☆

陶晓军<sup>1</sup>, 唐红波<sup>1</sup>, 凌 凯<sup>1</sup>, 王 艳<sup>1</sup>, 张其清<sup>1,2</sup>

## Synthesis of cholesterol-modified pullulan and its self-assembled behavior

Tao Xiao-jun<sup>1</sup>, Tang Hong-bo<sup>1</sup>, Ling Kai<sup>1</sup>, Wang Yan<sup>1</sup>, Zhang Qi-qing<sup>1,2</sup>

## Abstract

**BACKGROUND:** Carboxyl group is introduced to hydrophobically modify polysaccharides, which could self-aggregate to nanoparticles with some surface charges, and it is beneficial to improving their stability and performing the good properties as a drug carrier.

**OBJECTIVE:** To synthesis cholesterol hydrophobically modified carboxyethyl pullulan (CHS-CEP), and to study their self-aggregated behavior in aqueous solution and characteristics of CHS-CEP nanoparticles.

**METHODS:** Acrylic acid and pullulan polysaccharides could form carboxyethyl pullulan (CEP) by additive reaction. Objective material could be obtained by catalyzing CEP and CSN. The synthesized material was characterized using proton magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR). The nanoparticles were prepared by dialysis to characterize the morphology, size and zeta potential by transmission electron microscopy (TEM) and dynamic laser scattering (DLS).

**RESULTS AND COCLUSION:** By <sup>1</sup>H-NMR analysis, it showed that CHS-CEP was successfully synthesized and this material could self-aggregate to form nanoparticles with opalescence. The diameter of CHS-CEP nanoparticles was about 148.6 nm and their zeta potential was -19.9 mV. They could act as drug carrier due to many excellent properties such as a good dispersity in aqueous solution, even distribution and long-term stability.

Tao XJ, Tang HB, Ling K, Wang Y, Zhang QQ. Synthesis of cholesterol-modified pullulan and its self-assembled behavior.

Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(51): 9633-9636.

[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

## 摘要

**背景:** 将羧基引入疏水改性的多糖, 使其自组装的纳米粒子带上表面电荷, 有利于提高其稳定性, 更好的发挥作为药物载体的优良性质。

**目的:** 观察合成胆甾醇疏水改性的羧乙基普鲁兰多糖在水溶液中的自组装行为及其纳米粒子的性质。

**方法:** 利用丙烯酸与普鲁兰多糖反应生成羧乙基普鲁兰多糖(CEP), 然后按前期方法合成胆甾醇琥珀酰基 N-羧基琥珀酰亚胺(CSN), 最后 CSN 和 CEP 在催化剂下生成目标物。应用核磁共振仪对产物进行表征。

**结果与结论:** 通过 <sup>1</sup>H-NMR 分析, 表明成功合成了胆甾醇疏水改性的羧乙基普鲁兰多糖, 该材料在水溶液中能自组装为具有乳光的球型纳米粒子。CHS-CEP 纳米粒子平均粒径为 148.6 nm, 平均 Zeta 电位约为 -19.9 mV, 在水溶液中分散度好, 分布均匀, 具有长期稳定性, 可作为良好的药物载体。

**关键词:** 透射电镜; 动态光散射分析仪; 药物载体; 羧乙基普鲁兰多糖; 胆甾醇; 纳米粒子

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.51.031

陶晓军, 唐红波, 凌凯, 王艳, 张其清. 胆甾醇疏水改性的羧乙基普鲁兰多糖合成及自组装性质[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(51):9633-9636. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

普鲁兰多糖是出芽短梗霉发酵产生的胞外多糖, 由 $\alpha$ -1, 4糖苷键和 $\alpha$ -1, 6糖苷键组成的麦芽三糖重复单元构成<sup>[1]</sup>。普鲁兰多糖具有很多优良的属性如无毒, 安全, 生物降解性好, 易溶解, 多羟基易修饰等特点, 因此被医药领域广泛关注<sup>[2]</sup>。小分子接枝普鲁兰多糖进行疏水改性是目前研究普鲁兰多糖的重要内容。脂肪链接枝普鲁兰多糖, 如Simona等<sup>[3]</sup>合成十二烷酸普鲁兰多糖改性材料, 并用FT-IR、<sup>1</sup>H-NMR表征其物化性质。

胆甾醇或脂肪烃长链修饰的普鲁兰多糖衍生物, 均具有疏水性, 可在水溶液中自组装成

水凝胶纳米粒子。胆甾醇基普鲁兰多糖纳米粒子的稳定性优于脂肪长链疏水改性普鲁兰多糖纳米粒子。改性普鲁兰多糖水凝胶纳米粒子的大小、密度和稳定性并非只与多糖链上的疏水基团多少有关, 选择基团的疏水性和其他基团的化学性质也是不容忽视的重要影响因素<sup>[4]</sup>。

胆甾醇疏水改性的普鲁兰多糖(CHP)纳米粒子作为药物载体已经被广泛的研究。CHP纳米粒子包载抗肿瘤药物具有靶向性, 缓释性。它包载蛋白药物如胰岛素、 $\alpha$ -糜蛋白酶后能很好的保护它们, 不易被酶降解<sup>[4-5]</sup>。尽管CHP纳米粒子作为药物载体有很多优良性, 但粒子之间容易黏附而聚集, 从而影响其稳定性。CHP纳米粒子是由多糖亲水骨架外壳和胆甾醇的疏水基团核心构成的。因此, 在外壳的多糖羟基

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Key Laboratory of Biomedical Material of Tianjin, Tianjin 300192, China;

<sup>2</sup>Research Center of Biomedical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China

Tao Xiao-jun☆, Doctor, Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Key Laboratory of Biomedical Material of Tianjin, Tianjin 300192, China  
taoxiaojun428@sohu.com

Correspondence to: Zhang Qi-qing, Doctor, Professor, Doctoral supervisor, Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Key Laboratory of Biomedical Material of Tianjin, Tianjin 300192, China; Research Center of Biomedical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China  
zhangqiq@126.com

Supported by: the National Major Science Research Plan of China, No. 2006CB933300\*; the Doctoral Foundation, No. 20091106120051\*

Received: 2011-04-11  
Accepted: 2011-09-12

<sup>1</sup> 北京协和医学院, 中国医学科学院生物医学工程研究所, 天津市生物医学材料重点实验室, 天津市 300192; <sup>2</sup> 厦门大学生物医学工程研究中心, 厦门大学医学院, 厦门市生物医学工程技术研究中心, 福建省厦门市 361005

陶晓军<sup>☆</sup>, 男, 1981 年生, 湖北省麻城市人, 汉族, 2011 年北京协和医学院毕业, 博士, 主要从事多糖疏水改性及其纳米粒子与生物大分子相互作用研究。  
taoxiaojun428@sohu.com

通讯作者: 张其清, 博士, 教授, 博士生导师, 中国医学科学院生物医学工程研究所, 天津市生物材料重点实验室, 天津市 300192; 厦门大学生物医学工程研究中心, 福建省厦门市 361005  
zhangqiq@126.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225  
(2011)51-09633-04

收稿日期: 2011-04-11  
修回日期: 2011-09-12  
(20110411005/W · W)

上接枝一些基团, 使其带上电荷, 由于粒子和粒子之间的电荷排斥力小, 有望提高纳米粒子的稳定性。

纳米粒子表面羧基化是常用的接枝电荷方法, 本实验室王银松成功合成了胆甾醇疏水改性的羧甲基壳聚糖(CCMC), 研究了 CCMC 纳米粒子的载药、药物释放、组织分布及其与牛血清白蛋白的作用<sup>[6-8]</sup>。实验成功合成了胆甾醇疏水改性羧乙基化的普鲁兰多糖, 将其自组装成纳米粒子, 观测了它的粒径分布, 形态及 Zeta 电位。结果表明, 胆甾醇改性的羧乙基普鲁兰多糖纳米粒子带负电荷, 且稳定性好, 有作为药物载体进一步研究的前景。

## 1 材料和方法

设计: 观察性实验。

时间及地点: 实验于 2009-03/07 在中国医学科学院生物医学工程研究所和天津大学完成。

主要试剂及仪器:

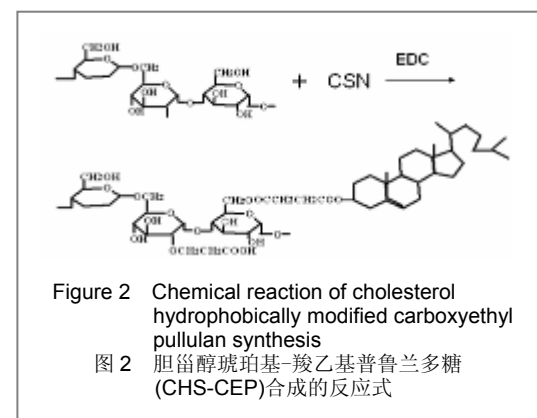
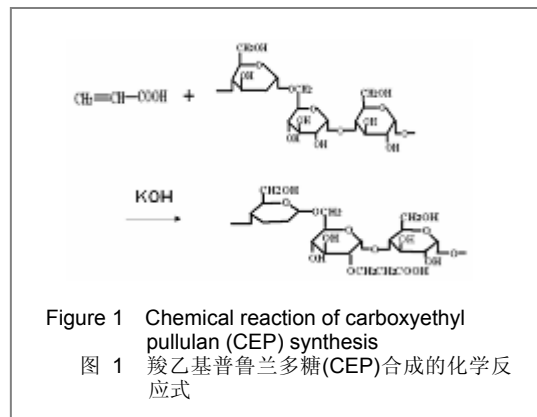
试剂及仪器	来源
普鲁兰多糖( $M_w=200\ 000$ )	日本林原有限公司
乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC)	上海共价化学科技有限公司
4-二甲氨基吡啶(DMAP)	Aldrich 公司
丙烯酸	天津市大茂化学试剂厂
胆甾醇	北京鼎国生物技术有限责任公司
琥珀酸酐	天津市福晨化学试剂厂
透析袋( $M_w\ 8\ 000\sim12\ 000$ )	中奥天元化学试剂有限公司
氢氧化钾及其他试剂	天津大学科威公司
核磁共振仪(VARINA INOVA 500 MHz)	美国 varian 公司
傅里叶变换红外光谱仪(FTS3000, BD-RAD)	赛默飞世尔科技公司
透射电镜(Tecna G <sup>2</sup> 20 S-Twin)	荷兰菲利普
动态光散射仪(Zetasizer 3000 HS, Malvern Instruments Ltd, Malvern UK)	马尔文仪器有限公司(英国)

实验方法:

胆甾醇基-羧乙基普鲁兰多糖的合成步骤:

羧乙基普鲁兰多糖(CEP)的合成, 见图1。

胆甾醇琥珀基-羧乙基普鲁兰多糖(CHS-CEP)的合成: 见图2。



合成方法:

羧乙基普鲁兰多糖(CEP)的合成: 在 250 mL 圆底烧瓶中加入 3.0 g 普鲁兰多糖固体颗粒, 25 mL 蒸馏水, 搅拌溶解。取氢氧化钾 1.05 g (氢氧化钾/糖单元=1.0 mmol/mmol) 溶液和丙烯酸 1.26 mL (丙烯酸/糖单元=1.0 mmol/mmol), 分别滴入反应瓶中, 50 °C 下反应 4 h 后停止。待反应液冷至室温, 将其滴入 500 mL 无水乙醇中, 获得黄褐色黏稠产物, 去上层醇液。加入 40 mL 蒸馏水溶解产物, 抽滤, 滤液装入透析袋(截留相对分子质量,  $M_w\ 8\ 000\sim12\ 000$ )。透析袋中样品用 pH 4~5 的 5 000 mL 稀盐酸溶液透析 2 d, 每隔 12 h 换水 1 次。再用 5 000 mL 去离子水透析 1 d, 每隔 12 h 换水 1 次, 透析完毕, 冻干得白色膜状固体, 即为羧乙基普鲁兰多糖。

胆甾醇琥珀基-羧乙基普鲁兰多糖(CHS-CEP)的合成: 取羧乙基普鲁兰多糖样品 0.5 g 溶解于 10 mL 无水的二甲基亚砜中, 置入 45 °C 油浴加热搅拌, 备用; 取一定量 N-羧基琥珀胆甾醇酯(CSN/glucose unit=0.1~0.5 mmol/mmol)、EDC (EDC/CSN=1.0 mmol/mmol), 溶解于 DMSO 与 THF 混合溶液中, 搅拌溶解得澄清溶液, 将其滴加到 45 °C 溶解好的羧乙基普鲁兰多糖溶液中, 反应 72 h, 停止反应。将反应液滴入 500 mL 无水乙醇中, 析出白色沉淀, 抽滤, 分别用适

量的乙醇、四氢呋喃和乙醚洗涤产物, 80 °C 下干燥, 得到白色固体颗粒, 即为合成的胆甾醇基羧乙基普鲁兰多糖。

**核磁共振:** 核磁共振仪测定普鲁兰多糖、羧乙基普鲁兰多糖和胆甾醇基-羧乙基普鲁兰多糖核磁共振图谱, 溶剂为DMSO-d<sub>6</sub>, 根据核磁共振图谱α-1, 4糖苷键, α-1, 6糖苷键, 亚甲基峰下面积求算羧乙基的取代度。

**自装置CHS-CEP纳米粒子的制备:** 取CHS-CEP聚合物10~20 mg, 加入2 mL DMSO溶解溶液转入透析袋, 放入5 L的蒸馏水中, 每隔4 h换水1次, 透析24 h, 将DMSO透析干净。透析后, 超声过滤, 定容为10 g/L, 观察外观。

**CHS-CEP纳米粒子的表征:** 铜网制样, 2%磷钨酸染色, TEM观测形态。将新制备的纳米粒子悬液放入比色杯中, 将比色杯放入动态光散射粒径仪样品池中进行测试, 每次样品测试3次, 每次1 min。同时用Zeta电位仪测定纳米粒子的电荷, 操作条件: 11.4 V/cm, 13.0 mA, 25 °C, 样本溶液的浓度维持在2 g/L, 溶剂为蒸馏水。

**主要观察指标:** 透射电镜和动态光散射分析仪表征纳米粒子的形态、粒径及电位。

## 2 结果与讨论

### 2.1 核磁共振分析

**胆甾醇基-羧乙基普鲁兰多糖(CHS-CEP)的合成:** 普鲁兰多糖、羧乙基普鲁兰多糖(CEP)和胆甾醇基-羧乙基普鲁兰多糖(CHS-CEP)的核磁共振图谱, 见图3。

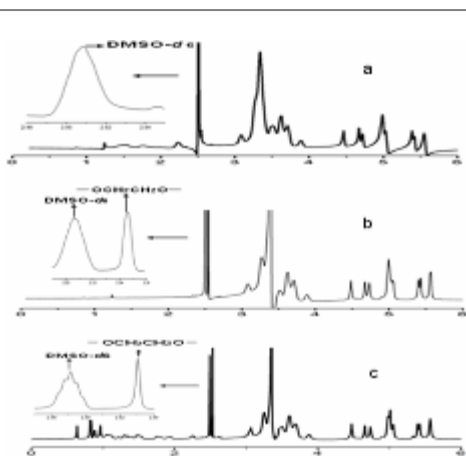


Figure 3 Nuclear magnetic resonance spectra of pullulan polysaccharide (a), carboxyethyl pullulan polysaccharide (b) and cholesterol hydrophobically modified carboxyethyl pullulan (c)  
图3 普鲁兰多糖的核磁共振图谱(a)、羧乙基普鲁兰多糖(CEP)的核磁共振图谱(b)和胆甾醇基-羧乙基普鲁兰多糖(CHS-CEP)的核磁共振图谱(c)

普鲁兰的<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>作为溶剂), 糖单元上氢依次为: 2.60~4.60(2H, 3H, 4H, 5H, 6H), 4.60(1Hα(1, 6)), 5.05(1Hα(1, 4)), 4.60~5.40(-OH), 从a图可以看出α-1, 4糖苷键和α-1, 6糖苷键特征峰明

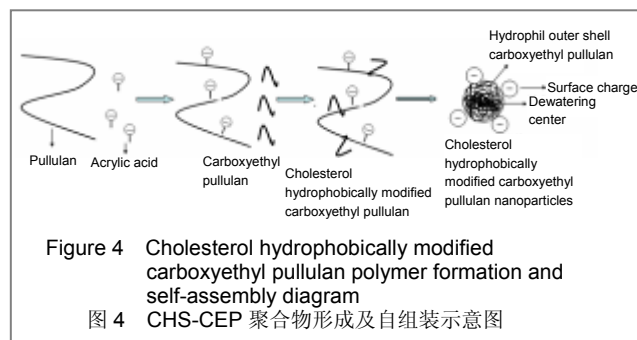
显, 2.51 ppm处为溶剂峰。b图保留了普鲁兰的特征峰, 在溶剂峰附近 2.53 ppm 出现了 2 个亚甲基(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-)的特征峰, 表明羧乙基成功接枝到普鲁兰多糖糖链上。c图在 2.53 ppm 具有 2 个亚甲基(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-)的特征峰, 在0.40~2.40(胆甾醇骨架上的氢)出现新的特征峰, 表明胆甾醇基连接到了羧乙基普鲁兰多糖上, CHS-CEP聚合物成功合成。

**计算取代度:** 普鲁兰多糖的糖单元是由α-1, 4糖苷键和α-1, 6糖苷键组成的, 因此α-1, 4糖苷键和α-1, 6糖苷键的个数之和即为普鲁兰多糖糖单元的数目。α-1, 4糖苷键和α-1, 6糖苷键上分别只有一个H, 可以用其特征峰下面积代表个数。2.53 ppm峰下面积代表2个亚甲基(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-)中氢个数, A<sub>δ2.53</sub>/4即可看作为(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-)的个数, 因此羧乙基在普鲁兰多糖上的取代度可以通过下列公式求算<sup>[9]</sup>:

$$DS = \frac{A_{\delta 2.53}}{4(A_{\delta 4.68} + A_{\delta 5.05})} \times 100\%$$

羧乙基的取代度为10.13%, 表示每100个糖单元接枝羧乙基10.13个。

**2.2 甾醇-羧乙基普鲁兰多糖(CHS-CEP)聚合物的自组装行为** 实验采用的普鲁兰多糖相对分子质量为200 000, 将羧乙基接枝到普鲁兰多糖使其带负电荷, 然后通过酯化反应将胆甾醇基连到普鲁兰多糖分子羟基上, 生成两亲性带电荷的CHS-CEP聚合物, 研究其在水溶液中的自组装行为, 见图4。



由于胆甾醇基团的强疏水性, CHS-CEP分子中的胆甾醇基和分子间的胆甾醇基通过疏水作用聚集在一起形成疏水中心, 外层糖链骨架形成亲水的壳, 壳表面羧基带负电。疏水药物如米托蒽醌、阿霉素、表阿霉素能负载在CHS-CEP纳米粒子的中心, 由于疏水中心的吸附作用及外层糖链的位阻, 能延长药物的释放。透析法制备CHS-CEP纳米粒, 外观有乳光, 稳定性良好, 在0~4 °C的冰箱里静置1个月无沉淀出现, 而胆甾醇疏水改性的普鲁兰多糖纳米粒子在同样的条件下2周后就开始有絮状物出现。

**2.3 投射电镜下的形态、粒径及Zeta电位测定** 两亲性CHS-CEP聚合物在水溶液中能自组装成纳米粒子, 投射



电镜下呈圆形, 动态光散射下测得CHS-CEP纳米粒子的平均粒径为148.6 nm, Zeta电位为-19.9 mV, 见图5~7。

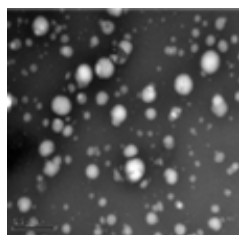


Figure 5 Projection electron microscope image of cholesterol hydrophobically modified carboxyethyl pullulan nanoparticles

图5 CHS-CEP 纳米粒子的投射电镜照片

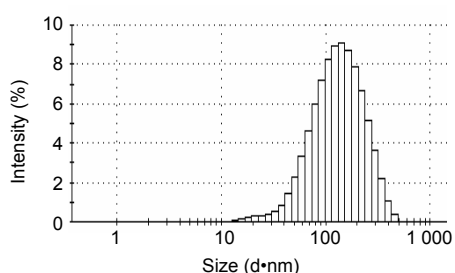


Figure 6 Particle size distribution of cholesterol hydrophobically modified carboxyethyl pullulan nanoparticles

图6 CHS-CEP 纳米粒子的粒径分布图

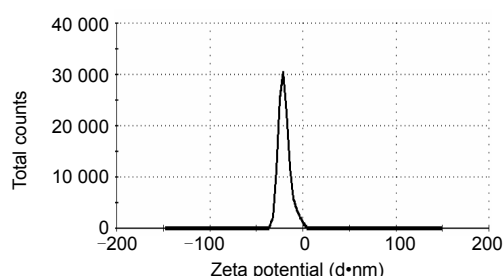


Figure 7 Zeta potential distribution of cholesterol hydrophobically modified carboxyethyl pullulan nanoparticles

图7 CHS-CEP 纳米粒子的 Zeta 电位分布图

文献报道, 胆甾醇基-普鲁兰多糖(CHP)纳米粒子的平均粒径在50~70 nm<sup>[9]</sup>, 并且随着胆甾醇取代度的增加CHP纳米粒子的粒径减小<sup>[10-11]</sup>。CHP聚合物表面不带电荷, 其形成的纳米粒子为中性粒子, 且平均粒径小于CHS-CEP纳米粒子。推测其原因可能为: CHP分子自装置成CHP纳米粒子是由于分子中的胆甾醇基团的强疏水作用, 而CHS-CEP分子带电荷, 存在电荷之间的相互作用, 导致分子和分子间的自装置力减弱, 纳米粒子的球形结构相对松散, 粒径较大。因此, CHS-CEP聚合物上的羧基不光使其纳米粒子表面带上电荷, 还影响CHS-CEP分子的自装置行为。

结论: 实验通过加成反应将普鲁兰多糖羧乙基化,

然后使用琥珀酸酐连接臂将胆甾醇基连接到羧乙基普鲁兰上, 合成了胆甾醇基-羧乙基普鲁兰多糖(CHS-CEP)聚合物, 使其在水溶液中自组装成纳米粒子, 研究纳米粒子自组装行为, 考察其形态、测定其粒径及电位。结果表明, 经过加成反应能将丙烯酸接枝到普鲁兰多糖的羟基上, 其取代度为10.13%, 核磁共振光谱显示胆甾醇基-羧乙基普鲁兰多糖(CHS-CEP)成功合成。两亲性的CHS-CEP聚合物在水溶液中能自组装成具有壳核结构的纳米粒子, 其中胆甾醇通过疏水作用构成中心, 外壳为亲水的糖链, 羧基游离在壳表面, 带负电荷。透射电镜下CHS-CEP纳米粒子呈圆形, 动态光散射测定平均粒径为148.6 nm, Zeta电位为-19.9 mV。长期静置, 无沉淀出现, CHS-CEP纳米粒子稳定性良好。

### 3 参考文献

- [1] Wallenfel SK, Bender H. Procedure for the production of a dextran-like polysaccharide from Pullularia pullulans: German Patent. 1096850 [P].1961-01-01.
- [2] Leathers TD. Biotechnological production and applications of pullulan. Appl Microbiol Biotechnol. 2003;62(5-6):468-473.
- [3] Sollustio S, Galantini L, Mesa CL. Hydrophobically Modified Pullulans: Characterization and Physicochemical Properties. J Phys Chem B. 2004;108:18876-18883.
- [4] Nishikawa T, Akiyoshi K, Sunamoto J. Supramolecular Assembly between Nanoparticles of Hydrophobized Polysaccharide and Soluble Protein Complexation between the Self-Aggregate of Cholesterol-Bearing Pullulan and  $\alpha$ -Chymotrypsin. Macromolecule. 1994;27:7654-7659.
- [5] Akiyoshi K, Kobayashi S, Shichibe S, et al. Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: complexation and stabilization of insulin. J Control Release. 1998;54:313-20.
- [6] Wang YS, Weng J, Zhang QQ. Preparation and characterization of self-aggregated nanoparticles of cholesterol-modified O-carboxymethyl chitosan conjugates. Carbohydrate Polymers. 2007;(69):597-606.
- [7] Wang YS, Jiang Q, Zhang QQ. The interaction between bovine serum albumin and the self-aggregated nanoparticles of cholesterol-modified O-carboxymethyl chitosan. Polymer. 2007; (48):4135-4142.
- [8] Wang YS, Jiang Q, Zhang QQ. Self-assembled nanoparticles of cholesterol-modified O-carboxymethyl chitosan as a novel carrier for paclitaxel. Nanotechnology. 2008;(19):145101.
- [9] Yang WZ, Chen HL, Gao FP, et al. Self-aggregated Nanoparticles of Cholesterol-modified Pullulan Conjugate as a Novel Carrier of Mitoxantrone. Current Nanoscience. 2010;6:298-306.
- [10] Kwon S, Park JH, Chung H, et al. Physicochemical characteristics of self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing 5-Cholanic acid. Langmuir. 2003;19(24):10188-10193.
- [11] Lee KY, Jo WH, Kwon IC, et al. Physicochemical characteristics of self-aggregates of hydrophobically modified chitosans. Langmuir. 1998;14(9):2329-2332.

#### 来自本文课题的更多信息—

**基金资助:** 国家重大科学研究计划项目 (2006CB933300); 博士点基金(20091106120051)。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**本文创新性:** 实验通过加成反应将羧乙基连接到普鲁兰多糖的糖链上, 该反应操作简单, 重复性强, 产率高, 可以作为多糖接枝羧基的模型反应。再经过酯化反应, 合成胆甾醇改性的羧乙基普鲁兰多糖聚合物, 观察其在水溶液中的自组装行为, 结果提示 CHS-CEP 纳米粒子呈球形, 其粒径比胆甾醇普鲁兰纳米粒子大, 带负电荷, 长期稳定性良好, 适合做药物载体。